

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



69/500 037

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12P 21/06, C07K 1/00, 2/00 // 14/47		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/17518 (43) Date de publication internationale: 29 juin 1995 (29.06.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01500 (22) Date de dépôt international: 20 décembre 1994 (20.12.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/15764 23 décembre 1993 (23.12.93) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris Cédex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHOBERT, Jean-Marc [FR/FR]; 102, boulevard de Longchamp, F-44300 Nantes (FR). BRIAND, Loïc [FR/FR]; 1, rue Paul-Claudé, F-44300 Nantes (FR). HAERTLE, Tomasz [FR/FR]; 39, rue d'Orvault, F-44240 La-Chapelle-sur-Erdre (FR). (74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harlé & Phélip, 21, rue de La Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).			(81) Etats désignés: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ). Publiée Avec rapport de recherche internationale.
(54) Title: METHOD FOR PREPARING PEPTIDE PRODUCTS, AND RESULTING PRODUCTS (54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION DE PRODUITS PEPTIDIQUES ET PRODUITS OBTENUS (57) Abstract A method in which an esterification reaction is carried out on at least one esterifiable grouping of a protein or peptide contained in an animal or vegetable substrate, and said protein or peptide is exposed to a proteolytic enzyme. The esterification reaction is preferably carried out on at least one carboxylic grouping of the protein or peptide, advantageously by means of an aliphatic alcohol having 1-5 carbon atoms, or an activated derivative thereof. The method may be used to prepare novel peptide populations for use as ingredients or additives in food compositions, pharmaceuticals or cosmetics. (57) Abrégé Le procédé selon l'invention consiste à réaliser une réaction d'estérification sur au moins un groupement estérifiable d'une protéine ou d'un peptide contenu dans un substrat d'origine animale ou végétale, puis à soumettre ladite protéine ou ledit peptide à l'action d'une enzyme protéolytique. La réaction d'estérification est de préférence réalisée sur au moins un groupement carboxylique de la protéine ou du peptide; elle est avantageusement conduite par un alcool aliphatique possédant entre 1 et 5 atomes de carbone, ou un de ses dérivés activés. Ce procédé permet d'obtenir de nouvelles populations peptidiques susceptibles d'être utilisées à titre d'ingrédients ou d'additifs dans des préparations alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétologiques.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PROCEDE D'OBTENTION DE PRODUITS PEPTIDIQUES ET PRODUITS
OBTENUS

La présente invention concerne un procédé
d'obtention de produits peptidiques nouveaux, à partir
d'un substrat d'origine animale ou végétale contenant
au moins une protéine ou un peptide ; elle concerne
également les produits issus du procédé.

Selon la présente description l'expression
"produits peptidiques" définit des populations
peptidiques très variées pouvant contenir diverses
entités telles que des peptides, fractions peptidiques,
acides aminés, estérifiés et non estérifiés, et leurs
mélanges.

Les protéines d'origine animale ou végétale,
et les peptides issus de ces protéines, sont utilisés
très couramment dans tout genre d'industrie
(pharmaceutique, chimique, agro-alimentaire,
cosmétologique ...) en raison de leurs propriétés
chimiques ou physico-chimiques.

Les hydrolyses enzymatiques des protéines
laitières donnent naissance à des peptides aux
propriétés biologiques variées. Il en est ainsi des
peptides opiacés (Zioudrou C., Streaty R.A. et Klee
W.A. (1979), J.Biol Chem. 254, 2446-2449 ; Brantl V.,
Teschemacher H., Henschen A. et Lottspeich F. (1981)
Life Sci. 28, 1903-1909 ; Yoshikawa M., Yoshimura T.
et Chiba H. (1984), Agric. Biol. Chem. 48, 3185-3187;
Loukas S., Varoucha D., Zioudrou C., Streaty R.A. et
Klee W.A. (1983), Biochemistry 22, 4567-4573 ; Chiba
H., Tani F. et Yoshikawa M. (1989) J.Dairy Res., 56,
363-366 ; Fukudome S.I. et Yoshikawa M. (1992), FEBS
Lett 296, 107-111 ; Antila P., Paakkari I., Järvinen

A., Mattila M.J., Laukkanen M., Pihlanto-Leppälä A., Mäntsälä P. et Hellman J. (1991) *Int. Dairy Journal* 1, 215-229 ; Meisel H. et Frister H. (1989), *J.Dairy Res.* 56, 343-349).

5 On a également isolé des peptides antihypertenseurs (Maruyama S., Mitachi H., Tanaka H., Tomizuka N. et Suzuki H. (1987) *Agric. Biol. Chem.* 51, 1581-1586 ; Komura M., Nio N., Kubo K., Minoshima Y., Munekata E. et Ariyoshi Y. (1989) *Agric. Biol. Chem.* 53, 2107-2114), ainsi que des peptides
10 immunostimulants (Berthou J., Migliore-Samour D., Lifchitz A., Delettré J., Floc'h F. et Jollès P. (1987), *FEBS Lett.* 218(1), 55-58 ; Migliore Samour D., Floc'h F. et Jollès P. (1989) *J.Dairy Res.* 56, 357-362), ou des peptides antithrombotiques (Fiat A.M., Levy-Toledano S.P., Caen J. et Jollès P. (1989) *J. Dairy Res.* 56, 351-355).

20 D'autre part, les peptides issus des protéines du lait offrent également des propriétés physico-chimiques et interfaciales intéressantes (Fox P.F. et Mulvihill D.M. (1983), dans *Proceedings of IDF symposium*, Holsingor, Denmark, 188-259 ; Chobert J.M., Bertrand-Harb C. et Nicolas M.G. (1988a), *J.Agric. Food Chem.* 36, 883-892 ; Chobert J.M., Sitohy, M.Z. et Whitaker, J.R. (1988b) *J.Agric. Food Chem.* 36, 220-224 ; Chobert J.M., Bertrand-Harb C., Dalgalarrrondo M. et Nicolas M.G. (1989a), *J.Food Biochem.* 13, 335-352 ; Chobert J.M., Touati A., Bertrand-Harb C., Dalgalarrrondo M. et Nicolas M.G. (1989b), *J.Food Biochem.* 13, 457-473 ; Vuilleumard J.C., Gauthier S.

25
30

et Paquin P. (1989) Lait 69, 323-351 ; Turgeon L.S., Gauthier F.S., Mollé D. et Léonil J. (1992) J.Agric. Food Chem. 40, 669-675).

5 Au niveau nutritionnel et thérapeutique, l'hydrolyse enzymatique permet de réduire l'allergénicité des protéines sériques (Jost R., Monti J.C. et Pahud J.J. (1987) Food Technol. 41, 118-121).

10 On peut citer également, à titre de référence bibliographique pertinente, le brevet EP-22019 qui décrit un hydrolysats enzymatique total de protéines du lactosérum et les applications de cet hydrolysats à titre de médicament et en nutrition thérapeutique.

15 Du point de vue physiologique, les hydrolysats de protéines de lactosérum ont la propriété de stimuler la croissance de la régénération de la peau (Wenner V. (1982) Lait 62, 549-565).

20 Il est connu d'agir sur les protéines ou les peptides d'origine animale ou végétale pour modifier leurs propriétés, notamment par greffage de substituants. En particulier le document WO-A-9318180 décrit l'estérification de peptides d'origine animale ou végétale par un procédé dénommé "synthèse enzymatique d'esters alkyliques de peptides" nécessitant l'emploi d'enzymes possédant à la fois
25 une activité protéolytique et estérolytique. Le procédé en question se caractérise par la mise en contact simultanée du substrat protéique avec l'enzyme et un alcool, aboutissant à la formation d'esters alkyliques de peptides.

La présente invention a pour objet un procédé consistant à estérifier une matière protéique d'origine animale ou végétale contenant au moins une protéine ou un peptide, puis à hydrolyser par voie enzymatique la matière protéique estérifiée, ledit procédé conduisant à une population peptidique nouvelle.

La modification des protéines par estérification aboutit à une nouvelle famille de peptides aux propriétés physico-chimiques et biologiques originales.

Le procédé selon l'invention consiste à réaliser une réaction d'estérification d'au moins un groupement estérifiable de l'une au moins des protéines ou peptides contenus dans le substrat d'origine animale ou végétale, dans le but de modifier l'action ultérieure de l'enzyme (sites de coupure et cinétique de réaction).

A titre d'exemple non limitatif de substrat protéique ou peptidique susceptible d'être utilisé, on peut citer : les protéines laitières (caséines et protéines du lactosérum), le gluten de blé ou de maïs, la zéïne, les concentrats et isolats protéiques de soja, pois, féverole ... ou encore le collagène, la sérumalbumine, l'ovalbumine ...

Cette réaction d'estérification est conduite selon les procédures classiques, parfaitement connues de l'homme du métier (Voir par exemple le procédé d'estérification en milieu acide décrit par Fraenkel-Conrat H. et Olcott H.S. 1945., j. Biol. Chem. 161, 259-269). Elle est de préférence réalisée sur au moins un groupement carboxylique de la protéine ; elle est avantageusement conduite en milieu acide au moyen d'un

alcool (ou d'un dérivé activé de cet alcool obtenu selon les méthodes classiques bien connues de l'homme du métier).

Par exemple on propose l'utilisation d'un alcool aliphatique possédant entre un et cinq atomes de carbone (méthanol, éthanol ...).

Les conditions de mise en oeuvre de la réaction d'estérification (température, durée, pression, concentration en acide ...) sont fonction du taux d'estérification désiré et, plus généralement, des produits finaux que l'on désire obtenir.

La protéine estérifiée est ensuite soumise à l'action d'au moins une enzyme protéolytique, dans des conditions habituelles du domaine technique considéré, pour scinder la chaîne d'acides aminés (Voir par exemple l'ouvrage édité par A.Neuberger et K.Brocklehurst (1987), coll.New Comprehensive Biochemistry - Vol.16 - Hydrolytic Enzymes, pub. Elsevier, ou encore l'ouvrage édité par R.J. Beynon et J.S.Bond (1989), coll. The Practical Approach Series - Protolytic enzymes, a practical approach-IRL PRESS). Dans cette étape, toute enzyme protéolytique et/ou peptidasique (protéase, peptidase), peut être utilisée (pepsine, papaïne, trypsine, chymosine, chymotrypsine, thermolysine ...) ; l'hydrolyse peut être réalisée par l'une de ces enzymes ou par une pluralité d'entre elles, successivement ou simultanément.

Selon une variante du procédé de l'invention, la réaction d'estérification est précédée par une hydrolyse partielle de la protéine, au moyen d'une

ou de plusieurs enzymes protéolytiques ou peptidasiques. Le taux d'hydrolyse partielle est laissé à l'appréciation de l'opérateur qui aura une large latitude d'action en fonction des produits qu'il désire obtenir. La seule contrainte sera de ne pas obtenir
5 une hydrolyse totale de la protéine ou du peptide.

De façon étonnante, le fait de faire précéder par une réaction d'estérification l'opération d'hydrolyse, permet d'augmenter ou de changer la sensibilité de la protéine à l'hydrolyse enzymatique.
10 L'enzyme est "leurrée" par la modification de la protéine : en fonction des produits utilisés et des conditions opératoires, par rapport à la protéine native, on peut obtenir de nouveaux sites de coupure et/ou supprimer certains sites traditionnels. Cette
15 façon d'opérer permet l'obtention de sites de coupure atypiques qui conduisent à l'obtention de peptides nouveaux, dont certains au moins sont estérifiés.

La mise en oeuvre du procédé selon l'invention aboutit à un mélange de peptides ou d'acides aminés et de leurs esters. Ces peptides, acides aminés et esters correspondants peuvent ensuite être séparés et purifiés pour obtenir des populations homogènes.
20

Dans le cadre d'une estérification par un alcool aliphatique, on obtient une protéine estérifiée au niveau de son groupement carboxylique C-terminal et au niveau des groupements carboxyliques latéraux de certains des résidus aspartyls et/ou glutamyls. L'action ultérieure de l'enzyme protéolytique permet d'obtenir un peptide terminal dont le groupement
25 carboxylique C-terminal est estérifié ; tous les autres
30

peptides obtenus, estérifiés ou non, comportent un groupement carboxylique C-terminal non estérifié.

5 Cette substitution au niveau du groupe carboxyle permet de supprimer une charge négative sur la protéine ou le peptide obtenu (suppression de charge au-dessus du pK du COOH des acides aspartiques et glutamiques constitutifs). On augmente le point isoélectrique de la protéine ou du peptide ; on les rend plus basiques et plus hydrophobes ce qui entraîne une meilleure affinité et interaction avec les interfaces biologiques et artificielles chargées en majorité négativement.

10 Selon l'invention, le traitement de résidus d'acides aminés par estérification, suivi d'une protéolyse, permet de formuler de nouvelles protéines ou populations peptidiques. Les moyens à mettre en oeuvre sont simples, peu coûteux, non toxiques et préservent la majorité des valeurs nutritionnelles de la protéine.

15 Les peptides estérifiés obtenus ont des propriétés électrostatiques, une hydrophobicité et une amphiphilie différentes qui leur confèrent des propriétés interfaciales, physiologiques, biologiques et immunologiques particulières.

20 L'estérification peut aussi constituer un moyen simple pour augmenter la sensibilité d'une protéine structurée à une action enzymatique.

25 Les domaines d'application de l'invention sont variés ; les produits obtenus peuvent avantageusement être utilisés à titre d'ingrédients, d'additifs ou d'agents actifs dans des préparations alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétologiques.

30

De telles applications sont similaires à celles déjà décrites pour les hydrolyses enzymatiques de protéines connues, telles qu'elles ont été rappelées dans les références bibliographiques citées au début de la description et illustrant l'art antérieur.

Exemples

Exemple 1 : Protéolyse pepsique de la bêta-lactoglobuline

La bêta-lactoglobuline de bovin (variant B) est préparée selon la méthode de Mailliart, P., Rib. deau Dumas, B. (1988, j. FOOD Sci. 53, 743-745).

Estérification

Les esters de bêta-lactoglobuline sont préparés en utilisant un procédé dérivé de celui décrit par Fraenkel-Conrat, H., Olcott, H.S. (1945, j. Biol. Chem. 161, 259-268).

La bêta-lactoglobuline est mise en suspension dans l'éthanol pour obtenir une suspension à 2 %. Sous agitation, de l'acide chlorhydrique 12N est ajouté doucement pour obtenir une suspension de protéine-alcool 0,06-0,68N en acide. Cette préparation est placée sous agitation à 4°C pendant plusieurs jours en fonction du degré d'estérification désiré. Après séchage sous vide, les échantillons sont stockés à une température de -80°C. Un échantillon témoin est préparé de la même manière sans addition d'HCl.

Analyse des protéines estérifiées

Pour déterminer le degré d'estérification de la bêta-lactoglobuline avec l'éthanol, on a utilisé la réaction colorée utilisant l'hydrochlorure d'hydroxylamine développée par Halpin, M.I., Richardson, T. (1945, j. Dairy Sci. 68, 3189-3198), modifiée selon Bertrand-Harb, C., Chobert, J.M., Dufour, E., Haertle, T. (1991, Sci. Aliments 11, 641-652).

Dans le cas présent, la bêta-lactoglobuline a été estérifiée à 40 %.

Hydrolyse

Les échantillons de bêta-lactoglobuline et de bêtalactoglobuline estérifiée ont ensuite été hydrolysés par la pepsine (pepsine porcine : 3,200-4,500 BAEE U/mg de la société Sigma Chimie, St-QUENTIN FALLAVIER, FRANCE).

La pepsine (1 mg/ml de H₂O, en concentration initiale) est ajoutée dans un rapport enzyme/substrat protéique (E/S) de 2 %. Le mélange est placé à incubation à 37°C. Des échantillons sont prélevés après une, deux, quatre, vingt et quarante heures ; l'hydrolyse est stoppée par addition de 1,5 volume d'un tampon Tris-HCl 0,2M, pH8,0.

Résultats

Les divers peptides obtenus ont été purifiés et identifiés par leur composition en acides aminés et leur séquence N-Terminale.

Le profil chromatographique CLHP de l'hydrolysat pepsique (après 40 heures d'hydrolyse) de la bêta-lactoglobuline éthylée est représenté sur la figure

1 (Colonne C₁₈, porosité 10 microns, longueur 25 cm, diamètre intérieur 0,4 cm de la SFCC SHANDON, GAGNY, FRANCE).

5 La structure primaire de la bêta-lactoglobuline B apparaît sur la figure 2, avec les sites de coupure pepsiques(*).

La figure 3 montre, sous forme de tableaux, la composition en acides aminés et séquences N-Terminales des peptides pepsiques de la bêta-lactoglobuline éthylée (ester).

10 L'étude cinétique de l'action enzymatique sur un dérivé estérifié de la bêta-lactoglobuline montre que la protéine estérifiée est hydrolysée très rapidement en solution aqueuse alors que la protéine native est insensible à une telle protéolyse.

15 L'invention rend possible l'hydrolyse de cette protéine qui, sans la modification décrite ne serait pas hydrolysée ; d'autre part, elle conduit à la création de sites de coupure non conventionnels pour l'enzyme utilisé.

20 Pour la bêta-lactoglobuline éthylée, 31 sites de coupure ont été identifiés : Gln5-Thr6 ; Thr6-Met7 ; Leu10-Asp11 ; Asp11-Ile12 ; Gln13-Lys14 ; Trp19-Tyr20 ; Leu22-Ala23 ; Ser27-Asp28 ; Asp28-Ile29 ; Leu32-Asp33 ; Leu39-Arg40 ; Val41-Tyr42 ; Leu46-Lys47 ; Ile56-Leu57 ;
25 Leu57-Leu58 ; Trp61-Glu62 ; Lys75-Thr76 ; Val81-Phe82 ; Phe82-Lys83 ; Leu87-Asn88 ; Glu89-Asn90 ; Val92-Leu93 ; Leu93-Val94 ; Asp98-Tyr99 ; Met107-Glu108 ; Leu117-Ala118 ; Asp130-Glu131 ; Leu133-Glu134 ; Phe136-Asp137 ; Asp137-Lys138 ; Leu149-Ser150.

Exemple 2 : Hydrolyse pepsique de la bêta-caséine

La bêta-caséine A1 brute est préparée selon la méthode décrite par Zittle, C.A., Custer, J.H. (1963, j. Dairy Sci. 46, 1183-1188). Le substrat est ensuite purifié par chromatographie selon la méthode de Mercier, J.C., Maubois, J.L. Poznanski, S., Ribadeau-Dumas, B. (1968, Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 521-530) sur une colonne Q-Sepharose fast flow (marque déposée), de la Société PHARMACIA, UPPSALA, SUEDE.

Exemple 2aEstérification

La bêta-caséine estérifiée est préparée en utilisant une modification de la méthode décrite par Fraenkel-Conrat et Olcott (1945), citée supra. La bêta-caséine purifiée est dispersée dans l'éthanol pour obtenir une suspension à 2 %. Sous agitation, on ajoute doucement à la suspension protéine-alcool de l'acide chlorhydrique 12N pour obtenir une suspension 0,06-0,68N en acide. Le produit obtenu est maintenu sous agitation à 4°C pendant plusieurs jours en fonction du degré d'estérification désiré. Après séchage sous vide, les échantillons sont stockés à une température de -80°C. Un échantillon témoin a été préparé de la même manière sans acide chlorhydrique.

Analyse des protéines estérifiées

La détermination du taux d'estérification de la bêta-caséine avec l'éthanol a été réalisée en utilisant la réaction colorée avec l'hydrochlorure d'hydroxylamine mise au point par Halpin et Richardson

(1985), modifiée selon Bertrand Harb et autres (1991). Dans le cas présent, la bêta-caséine a été estérifiée à 55 %.

Hydrolyse

5 La bêta-caséine et la bêta-caséine estérifiée (2 mg/ml) ont été dissoutes dans de l'acide citrique 20mM, pH2,6. La pepsine (1 mg/ml d'H₂O en concentration initiale) a été ajoutée dans un rapport enzyme/substrat protéique (E/S) de 0,2 %. Le mélange obtenu a été incubé à 20°C. Des échantillons ont été prélevés à 10 1, 2, 4, 20 et 40 Heures ; l'hydrolyse a été stoppée par addition de 1,5 volume d'un tampon Tris HCl 0,2M, pH8,0.

Exemple 2b

15 Une estérification similaire a été conduite sur la bêta-caséine avec du méthanol à la place de l'éthanol ; l'hydrolyse postérieure a été réalisée sur la bêta-caséine méthylée, d'une façon identique à celle de la caséine bêta éthylée décrite ci-avant. Pour cet exemple également, la bêta-caséine a été 20 estérifiée à 55 %.

Résultats

La figure 4 montre le profil chromatographique CLHP d'un hydrolysats pepsique de caséine bêta native après 10 Heures d'hydrolyse.

25 La figure 5 montre le profil chromatographique CLHP (après 10 heures d'hydrolyse) d'un hydrolysats pepsique de caséine bêta méthylée (ester), préparé selon l'exemple 2b.

La figure 6 montre le profil chromatographique CLHP (après 10 heures d'hydrolyse) d'un hydrolysats pepsique de caséine bêta éthylée (ester), préparé selon l'exemple 2a.

La figure 7 montre la structure primaire de la caséine bêta A1 avec les sites de coupure pepsique au sein de la caséine bêta native (*), au sein de la caséine bêta méthylée (+), et au sein de la caséine bêta éthylée (o).

Les figures 8, 9 et 10 montrent, respectivement et sous forme de tableaux, les compositions en acides aminés et séquences N-terminales des peptides pepsiques de la caséine bêta native, de la caséine bêta méthylée (ester) et de la caséine bêta éthylée (ester).

Dans le cas de la caséine bêta estérifiée, six sites de coupure nouveaux ont été identifiés : Glu11-Ile12 ; Asn73-Ile74 ; Met156-Phe157 ; Val162-Leu163 ; Leu198-Gly199 ; Ile207-Ile208.

Exemple 3 : Hydrolyse trypsique de la bêta-lactoglobuline

La bêta-lactoglobuline et la bêta-lactoglobuline estérifiée sont préparées selon l'exemple 1 et hydrolysées par la trypsine (trypsine bovine traitée TPCK 10,000-13,000 U/mg ; de la Société Sigma Chimie).

La bêta-lactoglobuline et la bêta-lactoglobuline estérifiée (2 mg/ml) sont dissoutes dans un tampon TrisHCl, 0,2M, de pH8,0. La trypsine, auparavant solubilisée dans HCl 0,01N, est ajoutée dans un rapport

enzyme/substrat protéique (E/S) de 2,5 %. Le mélange obtenu est incubé à 37°C et l'hydrolyse est stoppée après 24 Heures par l'addition de 0,5 volume d'HCl 0,2N.

5 Résultats

La figure 11 montre le profil chromatographique CLHP d'un hydrolysats trypsique de la bêta-lactoglobuline native (après 24 heures d'hydrolyse).

10. La figure 12 montre le profil chromatographique CLHP (après 24 heures d'hydrolyse) d'un hydrolysats trypsique de la bêta-lactoglobuline éthylée (ester).

15 La figure 13 montre la structure primaire de la bêta-lactoglobuline B ; on y indique les 16 peptides trypsiques obtenus et le site de clivage atypique (*) de la bêta-lactoglobuline estérifiée.

20 Les figures 14a, 14b et 14c montrent, sous forme de tableaux, la composition en acides aminés et séquences N-terminales des peptides trypsiques de la bêta-lactoglobuline native et de la bêta-lactoglobuline éthylée.

25 L'analyse des peptides trypsiques de la bêta-lactoglobuline montre que l'estérification n'empêche aucune liaison cible d'être coupée même quand un résidu aspartyle ou glutamyle estérifié est au voisinage de la liaison cible, ce qui conduit à l'obtention de peptides estérifiés. Un site de coupure atypique a été mis en évidence : Met145-His146.

Exemple 4 : Hydrolyse tryptique de la bêta-caséine

La bêta-caséine et la bêta-caséine estérifiée obtenues selon l'exemple 2 ont été soumises à l'action de la trypsine (trypsine de bovin traitée TPCK ; 10,000-13,000 U/mg).

La bêta-caséine native et la bêta-caséine estérifiée (2 mg/ml) sont dissoutes dans un tampon Tris-HCl 0,2M, de pH8,0. La trypsine auparavant solubilisée dans HCl 0,01N est ajoutée dans un rapport enzyme/substrat protéique (E/S) de 1,25 %. Le mélange obtenu est incubé à 20°C ; l'hydrolyse est stoppée après 24 Heures par addition de 0,5 volume d'HCl 0,2N.

Résultats

La figure 15 montre le profil chromatographique CLHP d'un hydrolysate tryptique de caséine bêta native (après 24 heures d'hydrolyse).

La figure 16 montre le profil chromatographique CLHP (après 24 heures d'hydrolyse) d'un hydrolysate tryptique de caséine bêta méthylée (ester).

La figure 17 montre le profil chromatographique CLHP (après 24 heures d'hydrolyse) d'un hydrolysate tryptique de caséine bêta éthylée (ester).

La figure 18 montre la structure primaire de la caséine bêta A1 ; les lettres A à N indiquent les peptides tryptiques de la caséine bêta native et on a indiqué les sites de clivage atypique : pour la caséine bêta éthylée (o) et pour la caséine bêta méthylée (*).

Les figures 19a et 19b montrent, sous forme de tableaux, la composition en acides aminés et séquences N-terminales des peptides tryptiques de la caséine bêta native, de la caséine bêta méthylée et de la caséine bêta éthylée.

Comme pour la bêta-lactoglobuline, l'analyse des peptides tryptiques de la caséine bêta montre que l'estérification n'empêche aucune liaison cible d'être coupée, même quand un résidu aspartyle ou glutamyle estérifié est au voisinage de la liaison cible, ce qui conduit à l'obtention de peptides estérifiés. Des sites de coupure atypique ont été mis en évidence : Phe52-Ala53 ; Gln79-Thr80 ; Ser122-Gln123 ; Ser124-Leu125 ; Phe190-Leu191 ; Tyr193-Gln194 ; Val197-Leu198.

- REVENDICATIONS -

1.- Procédé d'obtention de produits peptidiques nouveaux consistant à soumettre un substrat d'origine animale ou végétale contenant au moins une protéine ou un peptide à une réaction d'estérification d'au moins un groupement estérifiable de ladite protéine ou dudit peptide, puis à réaliser une hydrolyse enzymatique de la protéine ou du peptide estérifié.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il consiste à réaliser la réaction d'estérification sur au moins un groupement carboxylique de la protéine ou du peptide.

3.- Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'estérification de la protéine ou du peptide est réalisée en présence d'un alcool.

4.- Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'estérification est réalisée en présence d'un alcool aliphatique possédant entre 1 et 5 atomes de carbone.

5.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la réaction d'estérification est précédée d'une hydrolyse partielle de la protéine.

6.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la réaction d'estérification est suivie d'une succession d'opérations d'hydrolyse au moyen de différentes enzymes protéolytiques ou peptidasiques.

7.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'on utilise un substrat protéique d'origine laitière contenant notamment de la bêta-caséine ou de la bêta-lactoglobuline.

8.- Mélange de peptides ou d'acides aminés et d'esters de peptides ou d'acides aminés, obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

9.- Peptide ou acide aminé estérifié obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10.- Produits peptidiques obtenus par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 dont la composition en acides aminés et séquences N-terminales sont décrites dans les tableaux des figures 3, 9, 10, 14.1, 14.2, 14.3, 19.1 et 19.2.

11.- Peptide estérifié au niveau de l'un au moins de ses groupements carboxyliques, à l'exception du groupement carboxylique C-terminal de l'enchaînement.

12.- Peptide selon la revendication 11 dont l'un au moins de ses groupements carboxyliques est estérifié par un alcool aliphatique possédant entre un et cinq atomes de carbone.

1 / 22

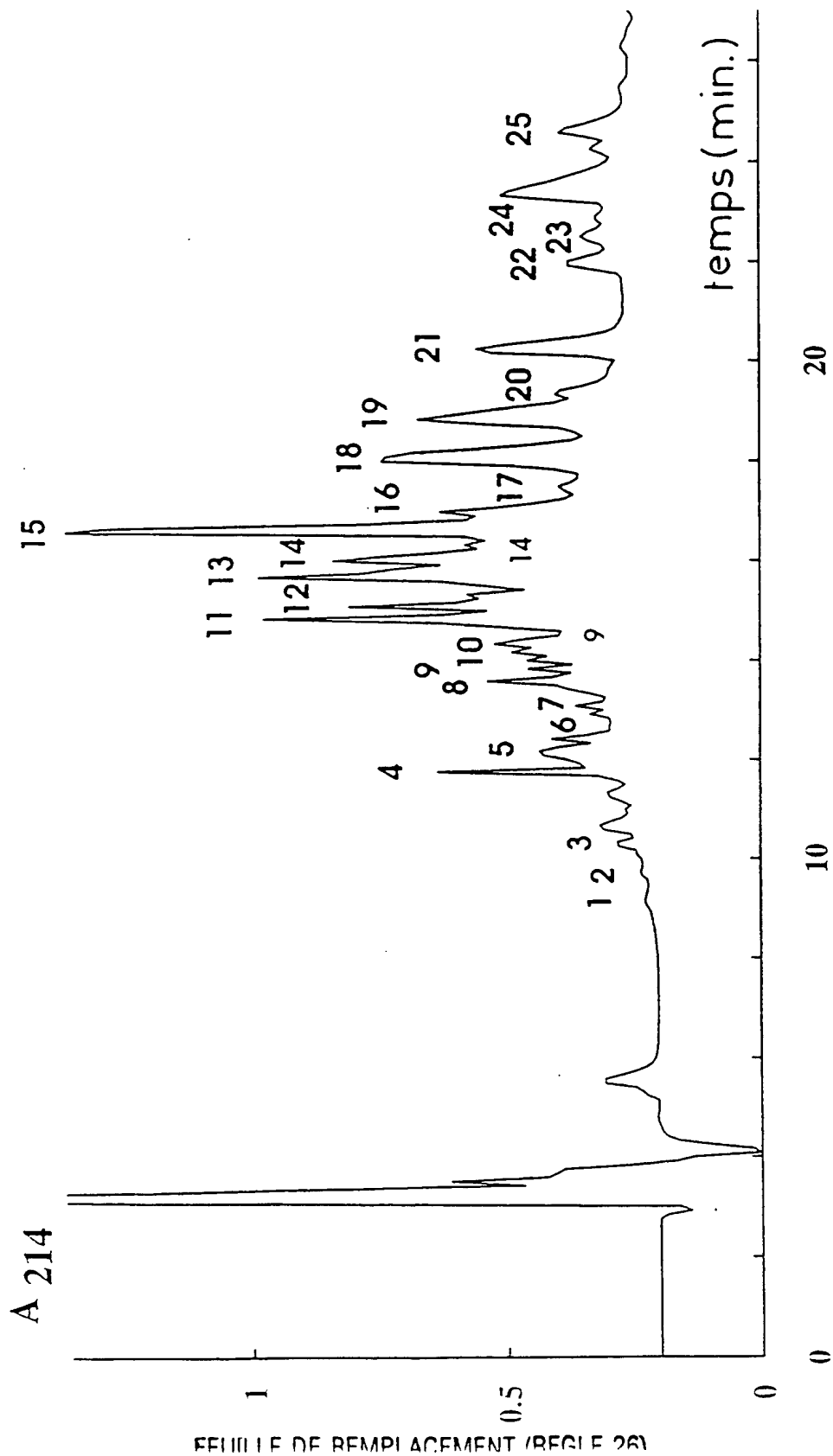


fig. 1

2 / 22

11.Leu-Ile-Val-Thr-Gln-Thr-Met-Lys-Gly-Leu-Asp-Ile-Gln-Lys-Val-Ala-Gly-Thr-Trp-Tyr-Ser-Leu-
 1 * * * * *
 Ala-Met-Ala-Ala-Ser-Asp-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg-Val-Tyr-Val-Glu-Glu-
 23 * * * * *
 Leu-Lys-Pro-Thr-Pro-Glu-Gly-Asp-Leu-Glu-Ile-Leu-Leu-Gln-Lys-Trp-Glu-Asn-Gly-Glu-Cys-Ala-
 36 * * * * *
 Gln-Lys-Lys-Ile-Ala-Glu-Lys-Thr-Lys-Ile-Pro-Ala-Val-Phe-Lys-Ile-Asp-Ala-Leu-Asn-Glu-Asn-
 68 * * * * *
 Lys-Val-Leu-Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys-Lys-Tyr-Leu-Leu-Phe-Cys-Met-Glu-Asn-Ser-Ala-Glu-
 91 * * * * *
 Pro-Glu-Gln-Ser-Leu-Ala-Cys-Gln-Cys-Leu-Val-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Asp-Asp-Glu-Ala-Leu-Glu-
 113 * * * * *
 Lys-Phe-Asp-Lys-Ala-Leu-Lys-Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg-Leu-Ser-Phe-Asn-Pro-Thr-Gln-Leu-
 135 * * * * *
 Glu-Glu-Gln-Cys-His-Ile.OH
 162
 157

-fig. 2-

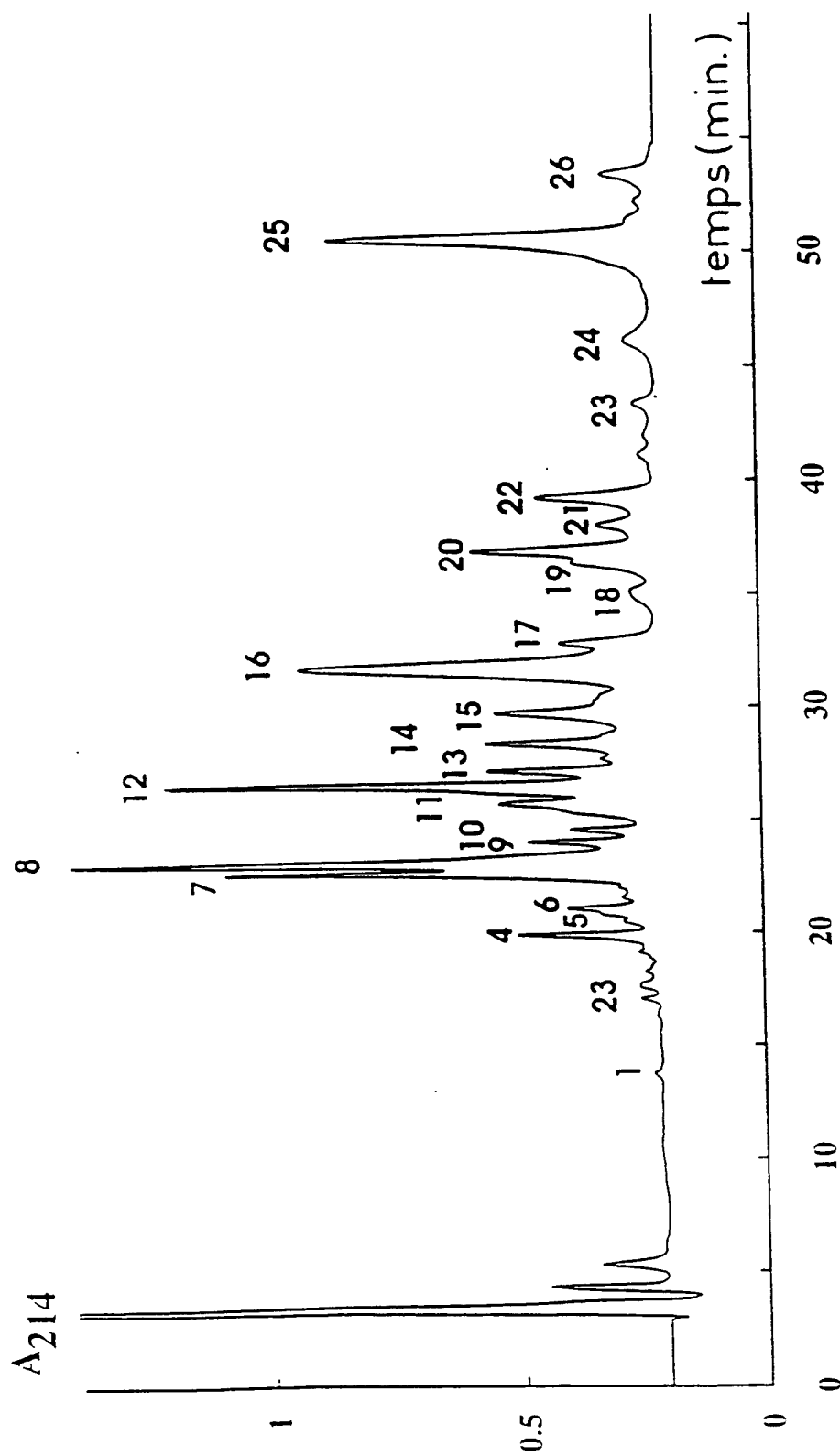
3/22

Peptide	1	2	3	4/5	6	7	8	9	10	11	12	13
Asx		0.99 (1)	0.92 (1)				1.14 (1)	0.84 (1)	0.98 (1)	1.63 (3)	0.97 (1)	
Glx	0.8 (1)		1.00 (1)	1.90 / 1.64 (2)	1.02 (1)	1.34 (1)		1.27 (1)	1.76 (2)	1.27 (1)	1.19 (0)	0.73 (1)
Ser			0.95 (1)				0.78 (1)	0.86 (1)			1.35 (3)	0.61 (1)
His												
Arg								0.77 (1)		1.13 (1)	1.99 (3)	2.23 (2)
Thr	1.21 (3)		1.35 (2)		0.87 (1)				0.77 (1)			
Ala			0.25 (1)									
Pro												
Tyr				0.27 / 0.26 (1)				0.55 (1)		0.41 (1)	0.62 (1)	0.72 (1)
Val	0.73 (1)	0.90 (1)		0.69 / 1.14 (1)			0.43 (1)	0.67 (1)		1.14 (1)	0.18 (1)	0.23 (1)
Met								0.98 (1)	0.87 (1)	1.25 (1)	0.65 (1)	0.84 (1)
Ile							0.91 (1)		0.63 (1)		2.33 (3)	1.34 (2)
Leu			0.82 (1)	0.94 / 0.14 (1)	0.84 (1)	0.48 (1)						
Phe						0.68 (1)	0.84 (1)	0.83 (1)	0.97 (1)	1.92 (2)	0.59 (0)	0.69 (1)
Lys		0.91 (1)										
N-Term	Ala-Met-Ala	Asn-Lys-Val	Asp-Ala-Gln	Tyr-Val-Glu	Glu-Ala-Leu	Glu-Lys-Phe	Met-Lys-Gly	Thr-Met-Lys	Glu-Ala-Leu	Lys-Ile-Asp	Tyr-Ser-Leu	Leu-Ile-Val
Sequence	Ala23-Ser27	Asn90-Val92	Asp33-Leu39	Tyr42-Leu46	Glu31-Leu133	Glu34-Phe136	Met7-Asp11	Thr6-Gln13	Glu131-Asp137	Lys83-Leu93	Tyr20-Leu32	Leu1-Leu10

Peptide	14	15	16	17	18	19/20	21	22	23	24	25
Asx	1.51 (2)		0.56 (1)	1.96 (2)	0.71 (1)	3.20 / 2.96 (3)	0.49 (1)	1.46 (2)	0.96 (1)		0.74 (1)
Glx	3.26 (5)	0.48 (1)	4.98 (5)	5.75 (6)	1.83 (4)	3.92 / 4.01 (4)	0.63 (0)	1.60 (1)	0.32 (0)		
Ser	1.13 (1)			1.90 (2)	0.62 (2)	2.08 / 1.96 (1)				0.96 (1)	
Gly	0.80 (1)	1.58 (1)	0.85 (1)	1.20 (1)						0.98 (0)	
His						0.00 / 0.12 (1)					0.41 (1)
Arg	0.46 (1)			1.23 (1)							0.43 (1)
Thr	0.74 (1)	1.36 (1)	1.32 (1)	1.21 (1)	0.47 (0)	1.82 / 1.65 (2)		0.85 (1)	0.92 (1)		
Ala	2.04 (2)	1.02 (1)	2.20 (3)	2.50 (2)	0.91 (1)	0.52 / 0.47 (0)		1.15 (2)	1.23 (2)	1.42 (2)	
Pro	1.74 (3)		1.00 (1)	2.35 (3)	0.80 (1)	0.94 / 0.83 (1)		1.00 (1)	1.12 (1)	0.91 (1)	
Tyr	0.21 (1)			0.33 (1)	1.03 (2)	0.89 / 0.78 (2)					
Val	1.36 (2)	0.63 (1)	0.61 (1)	1.60 (2)		0.42 / 0.38 (1)	0.94 (1)	0.91 (1)	0.88 (1)		0.43 (1)
Met				0.3 (0)	0.45 (1)	0.42 / 0.46 (1)					
Cys			0.40 (1)		0.46 (1)	0.46 / 0.51 (2)					
Ile	0.86 (1)	0.92 (1)	3.47 (3)	1.89 (2)	0.60 (0)	0.52 / 0.63 (1)		1.02 (2)	1.53 (2)	1.03 (1)	1.12 (1)
Leu	2.7 (3)		1.14 (1)	4.60 (7)	3.01 (3)	3.96 / 3.58 (5)	1.10 (1)	1.12 (1)	2.61 (1)	1.96 (2)	1.98 (3)
Phe					0.43 (1)	1.82 / 1.87 (2)		0.75 (1)	0.52 (1)		
Lys	1.08 (1)	0.92 (1)	3.85 (5)	2.00 (2)	2.00 (2)	1.96 / 1.86 (2)	1.08 (1)	1.75 (2)	2.00 (2)		1.82 (2)
Trp		- (1)	- (1)	- (1)							
N-Term	Asp-Ala-Gln	Ile-Gln-Lys	Leu-Gln-Lys	Ile-Ser-Leu	Tyr-Lys-Lys	Leu-Val-Leu	Asn-Lys-Val	Thr-Lys-Ile	Thr-Lys-Ile	Ile-Ser-Leu	Asp-Lys-Ala
Sequence	Asp13-Ile56	Ile12-Trp19	Leu58-Val81	Ile29-Trp61	Tyr99-Leu117	Ser-Phe-Asn	Asn90-Leu93	Thr76-Glu89	Thr76-Leu87	Ile29-Leu32	Asp137-Leu149

fig. 3

4 / 22



-fig. 4-

5 / 22

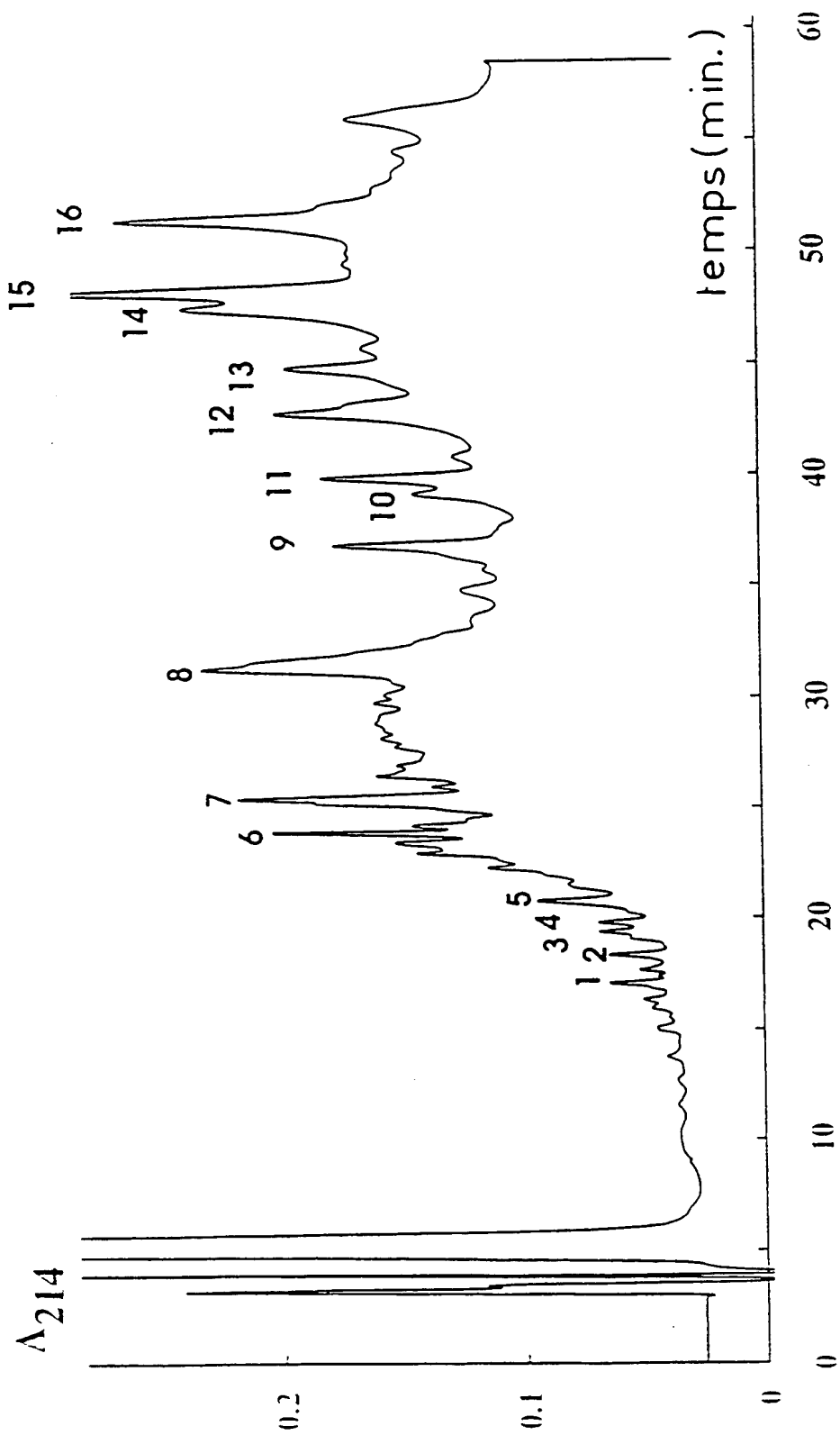
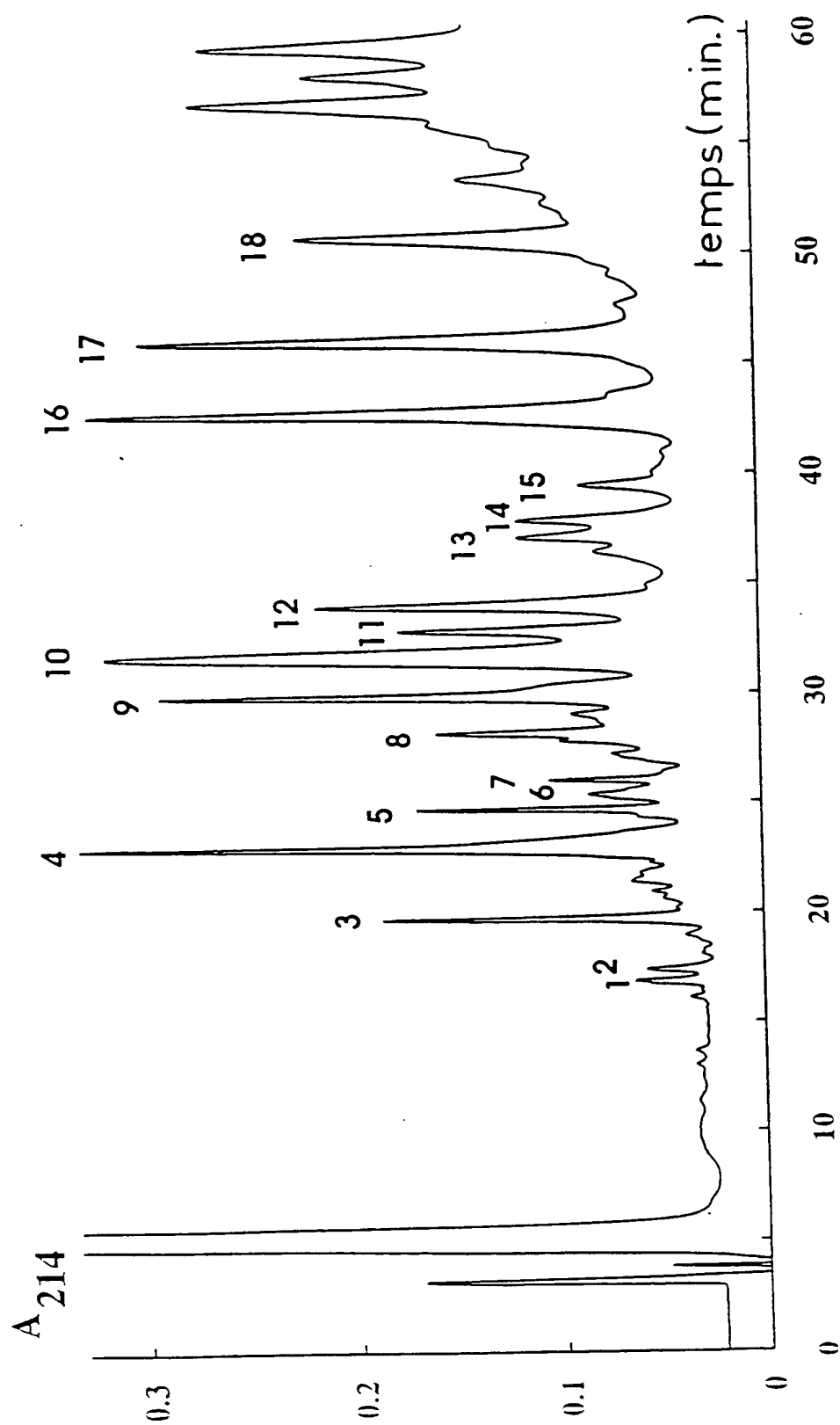


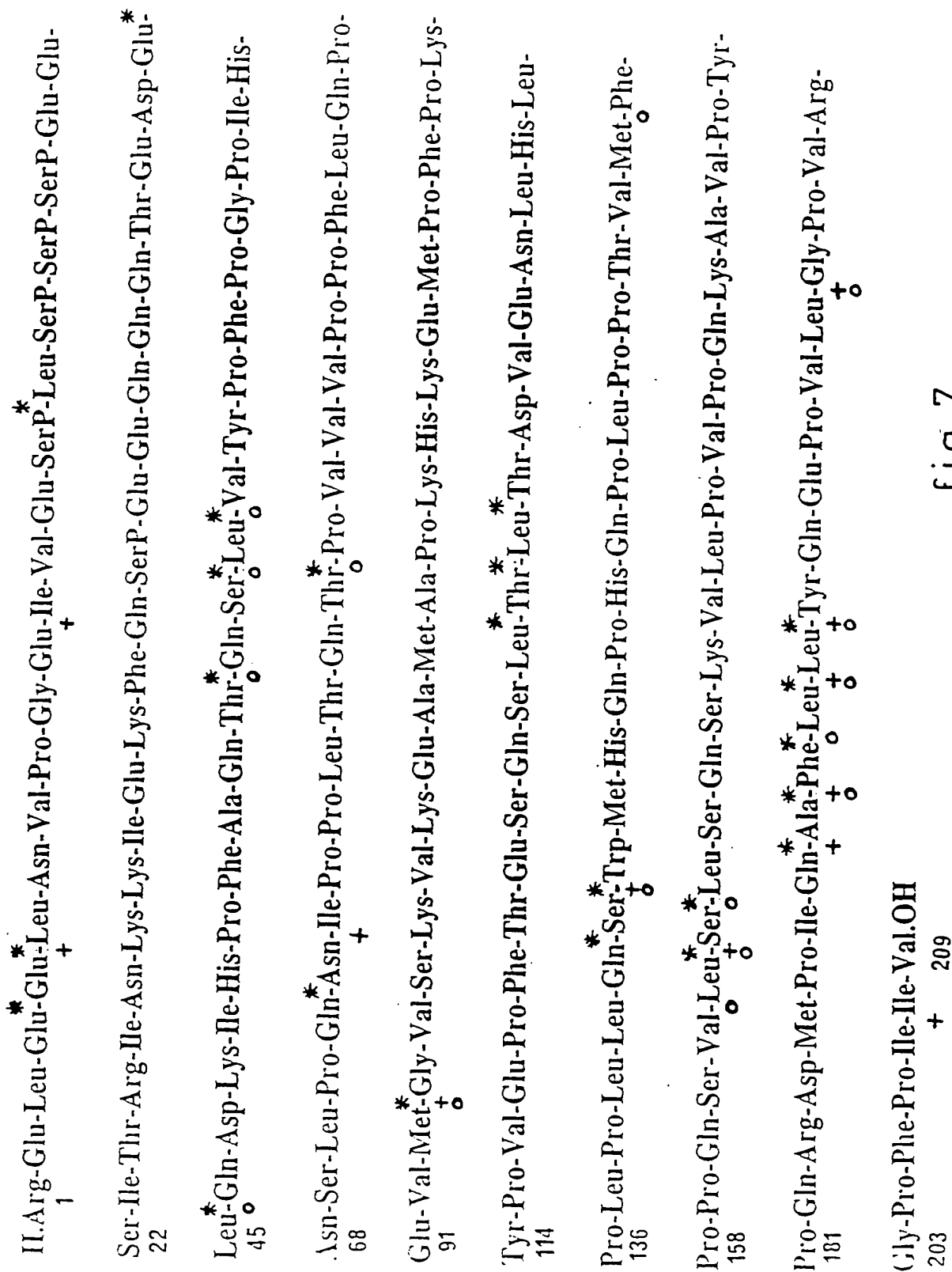
fig. 5

6 / 22



- fig. 6 -

7/22

fig 7

8 / 22

Peptide	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Asx	2.86 (3)	1.02 (1)	0.64 (1)	0.70 (1)		0.67 (1)	0.89 (1)	0.71 (1)	5.26 (3)	5.32 (5)		4.80 (3)	2.95 (3)
Glx		3.04 (3)	1.84 (2)	2.81 (3)		3.09 (1)	4.40 (4)	4.32 (4)	3.10 (3)	3.30 (3)		2.50 (3)	13.12 (16)
Ser		1.10 (1)		0.82 (1)		1.06 (1)	2.37 (3)	3.23 (3)	0.70 (1)	1.30 (1)		0.71 (1)	5.51 (6)
Gly									0.92 (1)	0.85 (1)		0.62 (1)	1.26 (1)
His		0.64 (1)	0.40 (1)	0.70 (1)		0.70 (1)		1.00 (1)	0.94 (1)	1.54 (2)		1.47 (2)	2.04 (2)
Arg	0.79 (1)					0.88 (1)			1.68 (2)	1.90 (2)		1.72 (2)	3.40 (4)
Thr		0.94 (1)	1.05 (1)	0.93 (1)		1.28 (1)	1.12 (1)	2.13 (2)	5.36 (5)	5.20 (5)		5.00 (5)	1.02 (1)
Ala		1.02 (1)	0.92 (1)	0.85 (1)	1.00 (1)	1.16 (1)	4.53 (5)	5.00 (5)	0.43 (1)	0.51 (1)		0.60 (1)	
Pro		1.02 (1)	1.12 (1)	0.80 (1)			0.14 (1)	0.91 (1)	2.91 (3)	2.98 (3)		3.31 (3)	2.00 (2)
Tyr							2.59 (3)	3.20 (3)	1.40 (2)	1.36 (2)		1.53 (2)	
Val							0.98 (1)	1.32 (1)	1.06 (1)	0.79 (1)	1.54 (2)	2.35 (2)	3.44 (4)
Met							0.73 (1)	1.00 (1)	1.80 (2)	1.81 (2)	0.94 (1)	1.90 (2)	3.57 (4)
Ile	1.06 (1)	0.80 (1)	0.90 (1)	0.97 (1)		0.67 (1)	1.39 (2)	2.73 (3)	4.80 (5)	4.94 (5)		4.54 (5)	0.97 (1)
Leu		0.92 (1)	0.65 (1)	1.02 (1)	0.76 (1)	1.62 (2)		0.61 (1)					3.00 (3)
Phe		0.93 (1)	1.08 (1)	1.24 (1)	0.85 (1)	1.12 (1)		2.23 (2)					
Lys						1.06 (1)	2.39 (2)						
N-Term	Arg-Glu-Leu	Gln-Asp-Lys	Gln-Asp-Lys	Gln-Asp-Lys	Ala-Phe-Leu	Leu-Gln-Asp	Ser-Leu-Ser	Ser-Leu-Ser	Gly-Val-Ser	Gly-Val-Ser	Phe-Leu-Leu	Gly-Val-Ser	Arg-Glu-Leu
Sequence	Arg1-Glu5	Gln46-Ser57	Gln46-Thr55	Gln46-Leu58	Ala189-Leu191	Leu45-Leu58	Ser164-Gln188	Ser164-Leu191	Gly94-Leu125	Gly94-Thr126	Phe190-Leu192	Gly94-Leu127	Arg1-Leu45

Peptide	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Asx	1.87 (2)	0.71 (1)		1.60 (2)	2.30 (2)		2.35 (2)	1.95 (2)	2.00 (2)	2.44 (2)	0.91 (1)	1.60 (2)	1.56 (2)
Glx	1.90 (2)	4.00 (4)	3.23 (3)	2.26 (2)	4.71 (5)	2.21 (2)		2.07 (2)			1.30 (1)	3.71 (4)	3.66 (4)
Ser	1.00 (1)	1.13 (1)	0.93 (1)	0.91 (1)	2.60 (3)		2.33 (2)		1.75 (2)	2.44 (2)	0.96 (1)	0.88 (1)	0.84 (1)
Gly	1.20 (1)	0.56 (1)		0.96 (1)	2.23 (3)		0.99 (1)	1.20 (1)			1.29 (1)	1.13 (1)	0.96 (1)
His	0.80 (1)		1.81 (2)						1.00 (1)	0.83 (1)	0.40 (1)	0.73 (1)	1.04 (1)
Arg				0.72 (1)	1.78 (2)			1.08 (1)				1.48 (2)	1.46 (2)
Thr	1.90 (2)		1.01 (1)										
Ala	5.20 (6)	0.97 (1)	6.00 (6)	2.19 (2)	7.75 (8)	4.10 (4)	4.00 (4)	2.36 (2)	3.58 (4)	3.77 (4)	4.00 (4)	8.43 (10)	8.64 (10)
Pro	0.54 (1)						0.31 (1)		0.34 (1)		0.25 (1)	0.34 (1)	0.77 (1)
Tyr	1.07 (1)	0.55 (1)	1.81 (2)	1.02 (1)	3.22 (3)	3.20 (4)	2.59 (3)	1.27 (1)	3.25 (3)	2.46 (3)	1.22 (1)	4.15 (5)	4.23 (5)
Val			1.55 (2)		1.17 (2)	0.51 (1)						0.54 (1)	0.72 (1)
Met							1.54 (2)		2.34 (2)	1.74 (2)	0.58 (1)	1.52 (2)	1.74 (2)
Ile	1.95 (2)	0.83 (1)			8.22 (8)	1.30 (1)	1.33 (1)	5.00 (5)	1.30 (1)	1.89 (2)	0.91 (1)	2.60 (3)	3.66 (4)
Leu	1.88 (2)	0.92 (1)	2.23 (2)	4.46 (5)	1.18 (1)	0.96 (1)	0.92 (1)		1.10 (1)	0.83 (1)	0.73 (1)	1.67 (2)	1.96 (2)
Phe	1.11 (1)		0.95 (1)										
Lys													
Trp													
N-Term	Val-Tyr-Pro	Glu-Glu-Leu	Trp-Met-His	Thr-Asp-Val	Leu-Thr-Asp	Pro-Val-Val	Tyr-Gln-Glu	Thr-Asp-Val	Leu-Tyr-Gln	Leu-Leu-Tyr	Val-Tyr-Pro	Val-Tyr-Pro	Leu-Val-Tyr
Sequence	Val59-Thr80	Glu4-Ser15	Trp143-Leu163	Thr128-Ser142	Leu127-Ser164	Pro81-Met93	Tyr193-Val209	Thr128-Gln141	Leu192-Val209	Leu191-Val209	Val59-Gln72	Val59-Met93	Leu58-Met93

fig 8

9/22

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10/14	11/16	12	13/15
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10/14	11/16	12	13/15
Asp	2.70/3.06 (3)	0.80 (1)	2.20 (2)	1.68 (2)	1.07 (1)	1.49 (2)	1.20 (1)	3.22 (3)	2.23/2.23 (2)	1.99/2.40 (2)	2.38 (2)	1.95/2.33 (2)
Glu		1.44 (1)			4.08 (4)		7.42 (7)					
Ser					3.13 (3)		3.40 (4)		1.65/1.77 (2)	1.51/1.64 (2)	0.60 (2)	0.59/0.84 (2)
Gly		1.00 (1)										
His							1.83 (2)					
Arg	1.00/0.85 (1)				1.34 (1)		0.87 (1)	1.48 (2)	0.35/0.32 (1)	0.44/0.35 (1)	0.30 (1)	0.36/0.39 (1)
Thr							1.23 (1)					
Ala					1.70 (2)		1.63 (2)					
Pro		1.14 (1)	0.77 (1)	0.89 (1)	5.10 (5)	1.13 (1)	4.96 (5)	5.58 (6)	3.43/3.66 (4)	3.20/3.50 (4)	3.50 (4)	3.50/3.50 (4)
Tyr			1.05 (1)	0.78 (1)	0.50 (1)	0.18 (1)	0.55 (1)		0.22/0.25 (1)	0.21/0.23 (1)	0.26 (1)	0.24/0.30 (1)
Val		1.04 (1)	0.34 (1)	0.42 (1)	3.03 (3)	0.85 (1)	3.95 (5)	3.30 (4)	1.48/1.65 (2)	2.30/2.78 (3)	1.82 (3)	1.58/1.86 (2)
Met				0.75 (1)	0.61 (1)		1.64 (3)	0.49 (1)				
Ile					1.07 (1)		1.37 (1)	1.03 (1)	0.69/0.57 (1)	1.70/1.61 (2)	1.93 (2)	1.16/1.38 (1)
Leu	1.31/1.06 (1)	1.07 (1)	0.92 (1)	2.46 (3)	2.70 (3)	2.30 (3)	4.20 (5)	1.87 (2)	1.36/1.36 (1)	0.75/0.67 (1)	0.53 (1)	0.67/0.71 (1)
Phe				0.83 (1)	0.49 (1)	1.00 (1)	1.81 (2)	1.01 (1)	0.70/0.73 (1)	0.80/0.81 (1)	0.77 (1)	0.71/0.73 (1)
Lys					1.91 (2)		2.00 (2)					
Tyr												
N Term	Arg1-Glu-Leu	Leu-Asn-Val	Tyr-Gln-Glu	Ala-Phe-Leu	Ser-Leu-Ser	Phe-Leu-Leu	Trp-Met-His	Ile-Pro-Pro	Leu-Tyr-Gln	Tyr-Gln-Glu	Leu-Tyr-Gln	Tyr-Gln-Glu
Sequence	Arg1-Glu5	Leu6-Glu11	Tyr193-Leu198	Ala189-Leu198	Ser164-Leu191	Phe190-Leu198	Trp143-Leu198	Ile74-Met93	Leu192-Ile207	Tyr193-Val209	Leu192-Val209	Tyr193-Ile207

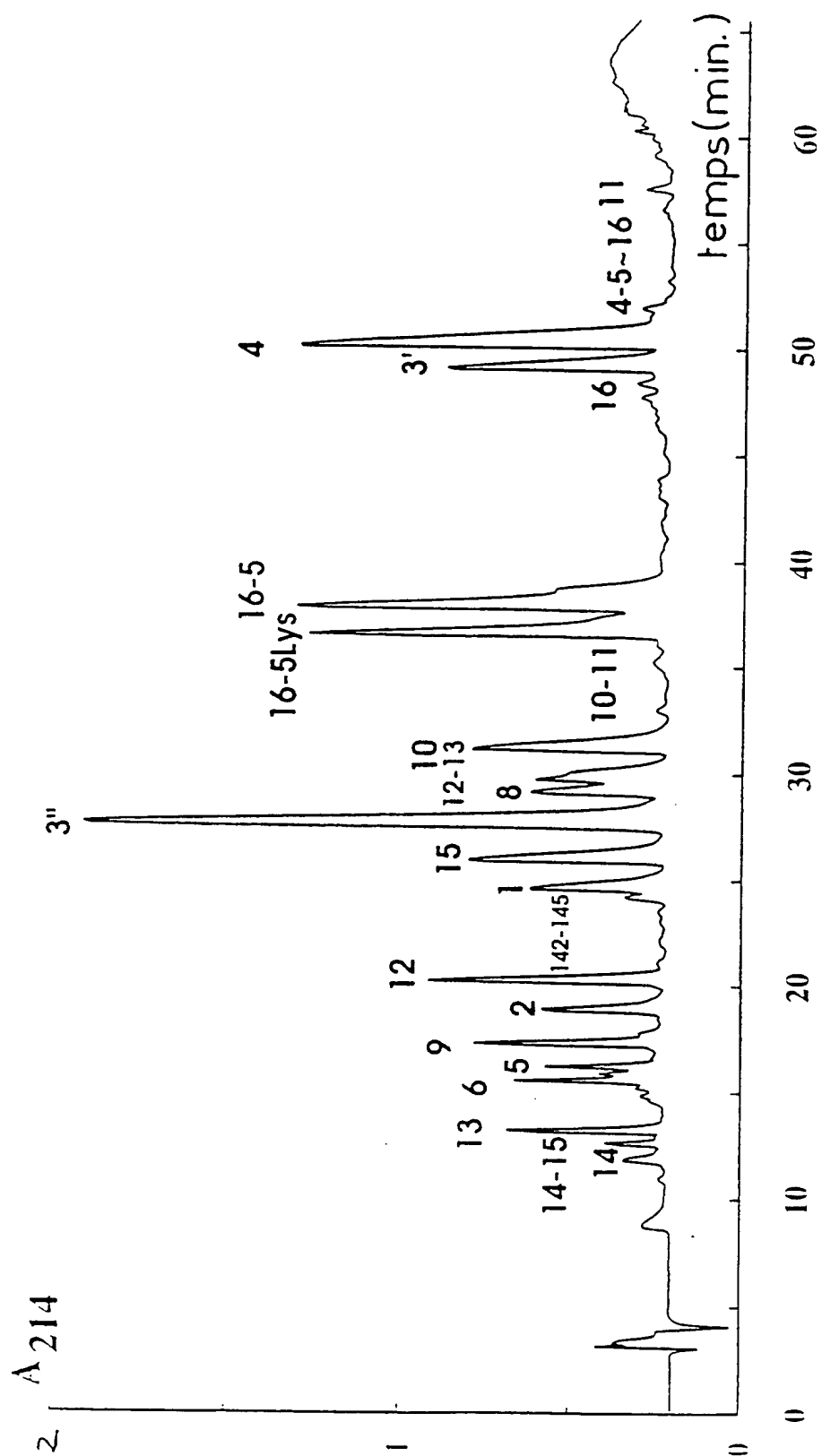
-fig. 9-

10/22

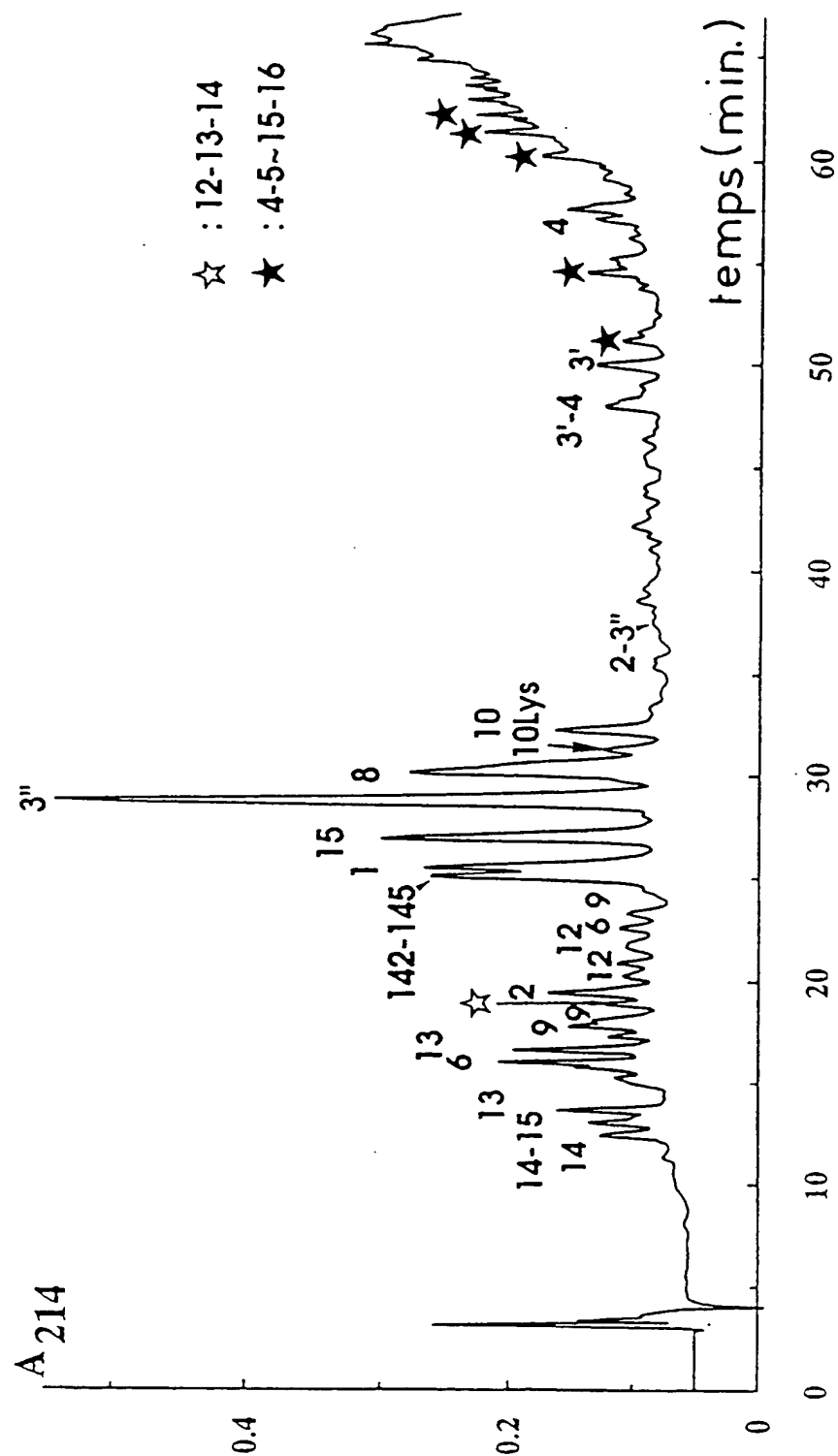
Peptide	1	2	3	4	5	6	7/11	8	9	10	12/14	13/16	15/17	18
Asx	0.63 (1)			1.36 (1)	1.09 (1)		1.03/1.00 (1)	1.51 (2)	0.86 (1)		1.25/0.62 (1)			1.33 (2)
Glx	3.33 (3)	1.94 (2)	2.36 (2)	4.55 (5)	4.60 (4)	1.49 (2)	3.95/4.14 (4)	2.45 (2)	4.20 (4)	3.26 (3)	4.41/3.32 (4)	2.18/1.96 (2)	2.12/2.34 (2)	4.65 (4)
Ser	0.56 (1)			4.00 (4)	2.72 (3)		2.40/2.34 (3)	1.18 (1)	2.02 (2)	1.43 (2)	3.16/1.92 (3)			1.22 (1)
Gly								0.93 (1)				1.24/1.44 (2)	1.74/1.42 (2)	0.89 (1)
His	0.83 (1)	0.78 (1)	0.68 (1)					0.45 (1)		1.40 (2)				0.81 (1)
Arg				0.78 (1)	1.06 (1)		1.20/0.82 (1)		0.89 (1)		1.06/0.83 (1)	0.54/0.68 (1)	0.99/0.70 (1)	
Thr	0.78 (1)	0.84 (1)	0.49 (1)					1.26 (2)		1.00 (1)				1.82 (2)
Ala	1.17 (1)	1.17 (1)	0.88 (1)	1.70 (3)	1.69 (2)		1.60/1.33 (2)		1.48 (2)		1.48/1.26 (2)			
Pro	1.00 (1)	0.95 (1)	0.92 (1)	7.08 (7)	4.44 (5)	1.00 (1)	4.25/5.00 (5)	4.89 (6)	4.65 (5)	6.00 (6)	5.24/4.73 (5)	4.47/3.24 (4)	3.67/3.52 (4)	9.05 (10)
Tyr				0.52 (1)	0.53 (1)	0.21 (1)	0.41/0.62 (1)	0.33 (1)	0.56 (1)		0.56/0.33 (1)	0.30/0.47 (1)	0.33/0.44 (1)	0.71 (1)
Val				2.83 (3)	2.94 (3)	0.55 (1)	2.45/2.82 (3)	1.33 (1)	2.80 (3)	2.21 (2)	3.42/2.81 (3)	2.88/2.36 (3)	2.36/2.37 (3)	4.35 (5)
Met				1.28 (1)	0.66 (1)					1.57 (2)				0.86 (1)
Ile	0.79 (1)	0.83 (1)	0.60 (1)	1.09 (1)	1.00 (1)		0.91/0.81 (1)	1.41 (2)	1.04 (1)		0.99/0.96 (1)	2.10/1.36 (2)	2.36/1.93 (2)	1.83 (2)
Leu			0.87 (1)	4.02 (4)	1.97 (2)	2.66 (3)	2.80/2.32 (3)	1.90 (2)	1.81 (2)	2.32 (2)	3.58/3.67 (4)	1.07/0.97 (1)	1.00/1.12 (1)	3.60 (2)
Phe	0.94 (1)	0.74 (1)	0.77 (1)	1.99 (2)		1.35 (1)	1.50/1.07 (1)	1.01 (1)	1.13 (1)	1.12 (1)	1.24/1.08 (1)	1.16/0.84 (1)	1.00/0.98 (1)	2.42 (2)
Lys	0.66 (1)	0.69 (1)	0.76 (1)	2.23 (2)	1.91 (2)		1.45/1.82 (2)		1.81 (2)		2.35/1.53 (2)			
Trp														
N-Term	Gln-Asp-Lys	Gln-Asp-Lys	Gln-Asp-Lys	Phe-Pro-Pro	Ser-Leu-Ser	Phe-Leu-Leu	Ser-Leu-Ser	Val-Tyr-Pro	Leu-Ser-Leu	Trp-Met-His	Ser-Leu-Ser	Tyr-Gln-Glu	Leu-Tyr-Gln	Val-Tyr-Pro
Sequence	Gln46-Ser57	Gln46-Thr55	Gln46-Leu58	Phe137-Leu191	Ser164-Ala189	Phe190-Leu198	Ser164-Leu191	Val59-Thr60	Leu183-Phe190	Trp143-Ser164	Ser164-Leu191	Tyr193-Val209	Leu192-Val209	Val59-Met93

-fig.10-

11/22

fig. 11

12 / 22



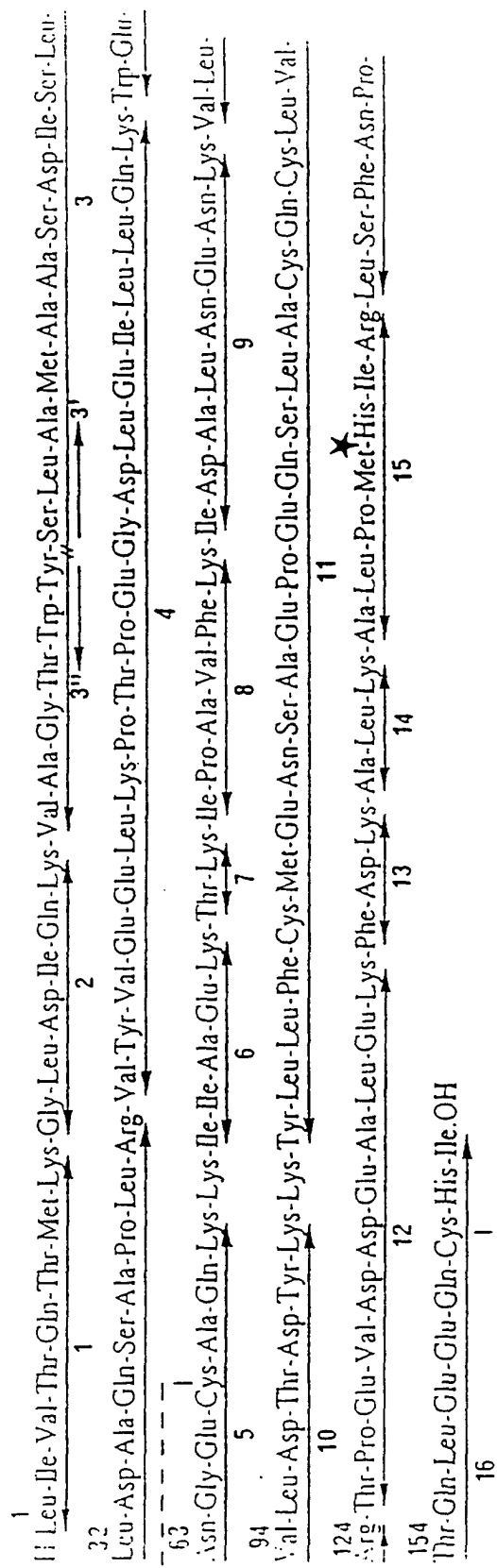


fig. 13

14 / 22

Peptides	.4.	.4-5-16.	.11.	.12-13-14.	.10Lys.	.2-3"	.3'-4.	.4-5-15-16.
Amino acid	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer
Asx	0.89	1 (1)	3.30	3 (3)	0.99	1 (1)	2.10	2 (3)
Glx	4.57	5 (5)	11.60	12 (12)	4.27	4 (5)	3.07	3 (3)
Ser	1.19	1 (1)	1.11	1 (1)	1.89	2 (2)		
Gly	1.19	1 (1)	2.00	2 (2)				
His			0.90	1 (1)				
Arg			0.64	1 (1)				
Thr	1.04	1 (1)	2.30	2 (2)				
Ala			1.41	1 (1)				
Pro	2.32	2 (2)	3.23	3 (3)				
Tyr	0.60	1 (1)	0.85	1 (1)				
Val	1.86	2 (2)	1.89	2 (2)				
Met								
Cys			1.23	1 (2)				
Ile	0.99	1 (1)	1.92	2 (2)				
Leu	4.25	4 (4)	6.36	6 (6)				
Phe			0.87	1 (1)				
Lys	1.83	2 (2)	2.89	3 (3)				
Tip								
N-Terminal Sequence	Val-Tyr-Val	Val-Tyr-Val	Val-Tyr-Val	Val-Tyr-Val	Val-Tyr-Val	Val-Tyr-Val	Val-Tyr-Val	Val-Tyr-Val
Sequence	Val41-Lys60	Leu-Ser-Phe	Tyr-Leu-Leu	Thr-Pro-Glu	Val-Leu-Val	Gly-Leu-Asp	Ser-Leu-Ala	Ala-Leu-Pro
Sequence	Val41-Lys60	Val41-Lys69	Tyr102-Arg124	Thr125-Lys141	Val92-Lys101	Gly9-Tyr20	Ser21-Lys60	Val41-Lys69
		Leu149-Ile162						Ala142-Ile162

fig. 14a

15 / 22

Peptides	.15.		.3"		.8.		.12-13.		.10.		.10-11.		.16-5Lys.		.16-5.		.16.		.3'	
	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer
Asx							2.68	3 (3)	1.99	2 (2)	3.44	3 (3)	1.86	2 (2)	1.76	2 (2)	0.78	1 (1)	1.72	2 (2)
Glx							2.82	3 (3)			3.64	4 (5)	6.75	7 (7)	6.58	7 (7)	3.46	3 (4)	1.03	1 (1)
Ser											1.20	1 (2)	1.03	1 (1)	1.19	1 (1)	1.00	1 (1)	3.48	3 (4)
Gly			1.03	1 (1)									0.68	1 (1)	0.64	1 (1)				
His	0.73	1 (1)											0.91	1 (1)	0.89	1 (1)	0.50	1 (1)		
Arg	0.88	1 (1)									0.52	1 (1)							0.92	1 (1)
Thr			1.05	1 (1)			0.71	1 (1)	0.98	1 (1)	0.85	1 (1)	0.96	1 (1)	0.96	1 (1)	0.76	1 (1)		
Ala	1.07	1 (1)	0.97	1 (1)	1.02	1 (1)	1.13	1 (1)			1.52	2 (2)	1.08	1 (1)	1.47	1 (1)			4.62	5 (5)
Pro	1.09	1 (1)			1.06	1 (1)	1.17	1 (1)			1.20	1 (1)	1.04	1 (1)	1.14	1 (1)	0.94	1 (1)	1.00	1 (1)
Tyr			1.04	1 (1)					0.77	1 (1)	1.39	1 (2)								
Val			1.30	1 (1)	0.93	1 (1)	1.09	1 (1)	1.73	2 (2)	2.24	2 (3)								
Met	1.01	1 (1)									0.36	0 (1)							0.79	1 (1)
Cys											1.28	1 (3)	1.24	1 (2)	1.16	1 (2)	0.30	0 (1)		
Ile	0.81	1 (1)			0.95	1 (1)							0.86	1 (1)	0.92	1 (1)	0.72	1 (1)	0.88	1 (1)
Leu	0.72	1 (1)					0.99	1 (1)	1.71	2 (2)	4.20	4 (6)	2.05	2 (2)	2.23	2 (2)	2.14	2 (2)	3.48	3 (4)
Phe					0.81	1 (1)	0.97	1 (1)			0.58	1 (1)	1.00	1 (1)	0.98	1 (1)	0.86	1 (1)		
Lys					0.89	1 (1)	1.87	2 (2)	0.89	1 (1)	2.12	2 (2)	1.96	2 (2)	1.04	1 (1)				
Trp				(1)										(1)		(1)				
N-Terminal Sequence	Ala1-Leu1-Pro		Val-Ala-Gly		Ile-Pro-Ala		Thr-Pro-Glu		Val-Leu-Val		Val-Leu-Val		Trp-Glu-Asn		Trp-Glu-Asn		Leu-Ser-Phe		Ser-Leu-Ala	
Sequence	Ala1-12-Arg1-18		Val15-Tyr20		Ile78-Lys83		Thr125-Lys138		Val92-Lys100		Val92-Arg124		Trp61-Lys70		Trp61-Lys69		Leu149-Ile162		Ser21-Arg40	

-fig.14b-

16 / 22

Peptides	.14.	.14-15.	.13.	.6.	.5.	.9.	.2.	.12.	.142-145.	.1.
Amino acid	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer	Molar ratio	Nearest integer
Asx			0.80	1 (1)	1.04	1 (1)	2.66	3 (3)	1.74	2 (2)
Glx					3.22	3 (3)	1.01	1 (1)	2.74	3 (3)
Ser					0.52	1 (1)	0.53	1 (1)		
Gly										
His										
Arg										
Thr										
Ala	1.10	1 (1)			0.92	1 (1)	1.16	1 (1)	1.11	1 (1)
Pro									0.87	1 (1)
Tyr									1.05	1 (1)
Val									0.90	1 (1)
Mct									0.74	1 (1)
Cys					0.31	0 (1)				
Ile							0.81	1 (1)		
Leu	1.02	1 (1)					0.79	1 (1)	0.96	1 (1)
Phe			0.91	1 (1)			0.99	1 (1)		
Lys	0.95	1 (1)	1.00	1 (1)	0.80	1 (1)	0.99	1 (1)		
Trp						(1)				
N-Terminal										
Sequence	Ala139-Lys141	Ala139-Arg148	Phe136-Lys138	Ile171-Lys75	Trp61-Lys69	Ile84-Lys91	Gly9-Lys14	Thr-Pro-Glu	Ala-Leu-Pro	Leu-Ile-Val
Sequence	Ala139-Lys141	Ala139-Arg148	Phe136-Lys138	Ile171-Lys75	Trp61-Lys69	Ile84-Lys91	Gly9-Lys14	Thr125-Lys135	Ala142-Met145	Leu1-Lys8

-fig. 14c-

17 / 22

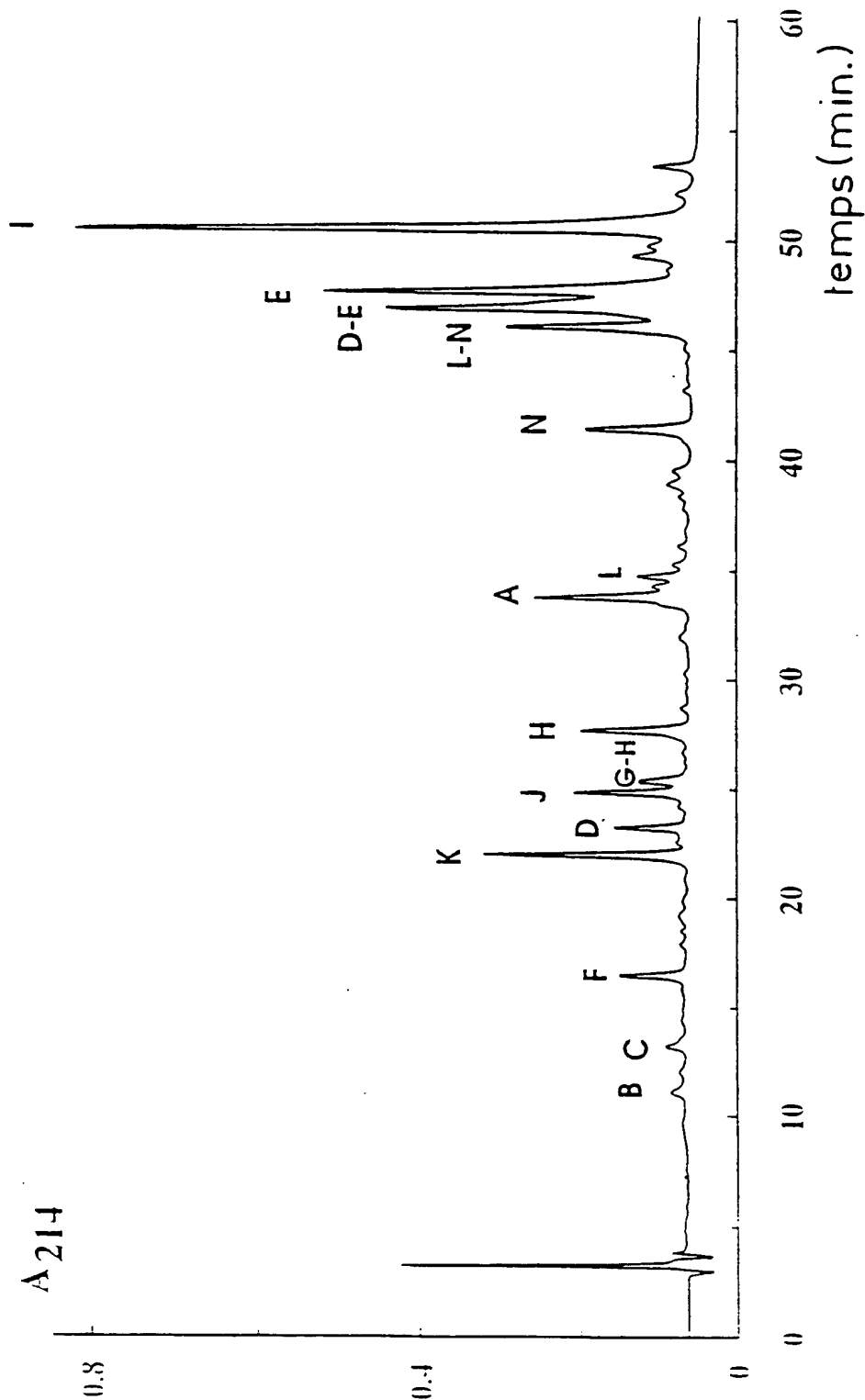
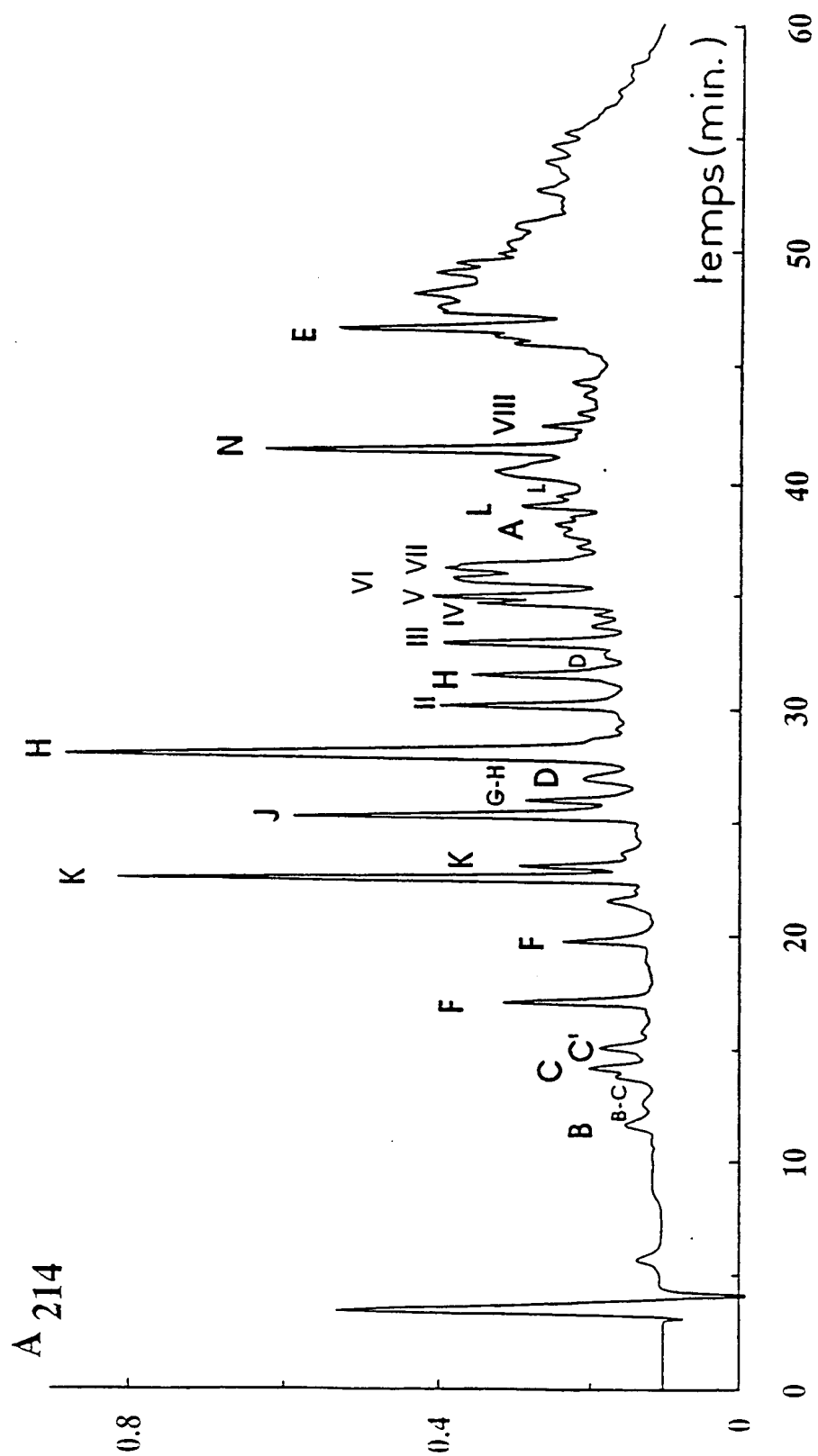
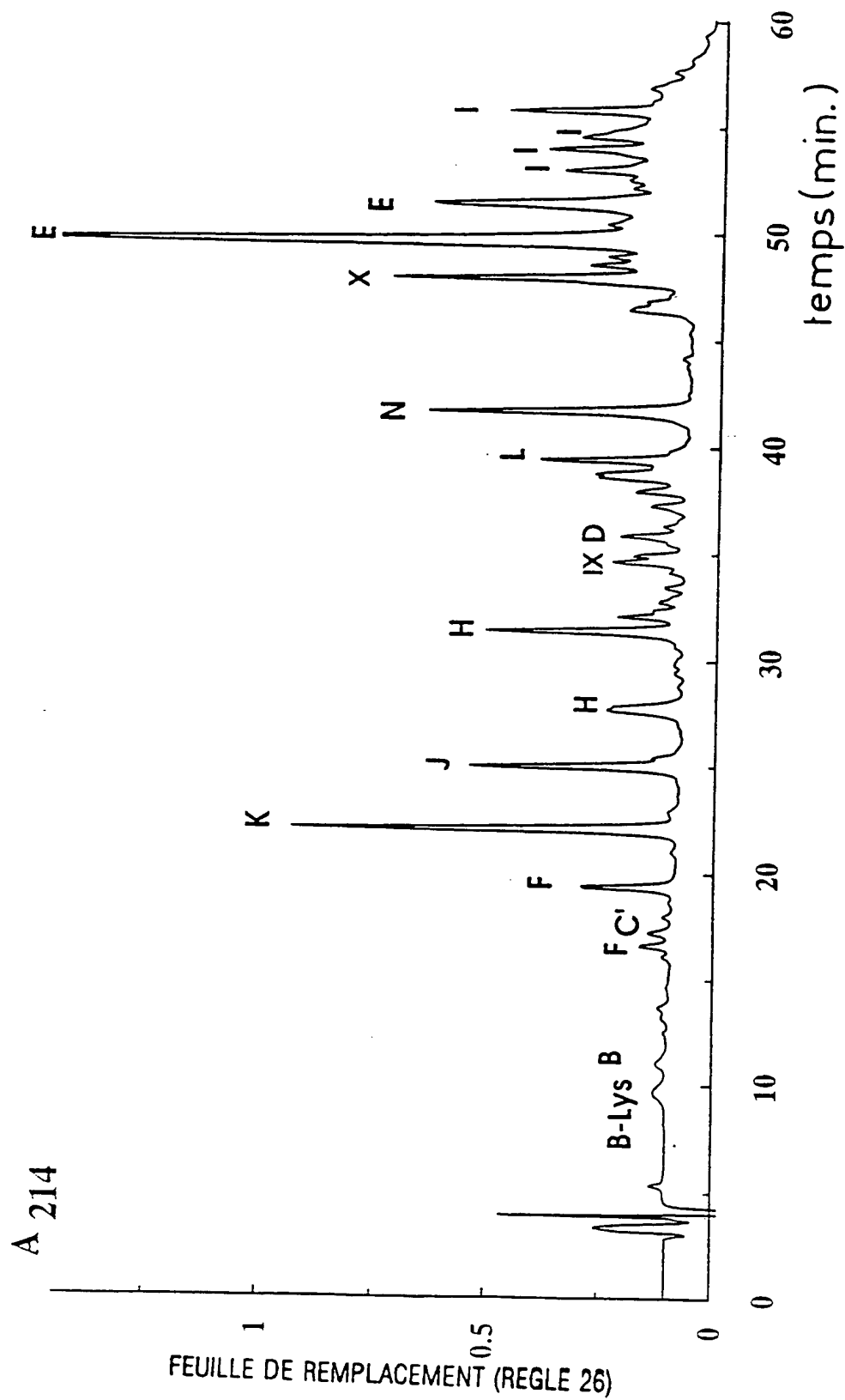


fig. 15

18 / 22

fig.16

19 / 22

-fig. 17-

21/22

Peptides	A	B	B'	C	C'	D	E	F	H	I	J
Amino acid	Molar ratio integer	Molar ratio integer	Molar ratio integer	Molar ratio integer	Molar ratio integer	Molar ratio integer	Molar ratio integer	Molar ratio integer	Molar ratio integer	Molar ratio integer	Molar ratio integer
Asx	0.80 1 (1)	0.80 1 (1)	0.89 1 (1)	1.35 1 (1)	1.18 1 (1)	1.54 2 (2)	1.60 2 (2)	1.07 1 (1)	1.20 1 (1)	1.37 1 (2)	
Glx	5.63 6 (7)					9.00 9 (9)	6.40 6 (6)			7.61 8 (9)	1.09 1 (1)
Ser	3.36 4 (5)					0.60 1 (1)	2.25 2 (3)			5.63 6 (7)	
Gly	1.00 1 (1)						2.30 2 (2)				
His							- (2)			2.54 3 (3)	
Arg	1.00 1 (1)						1.92 2 (3)				
Thr	0.78 1 (1)					0.93 1 (1)	0.65 1 (1)	1.57 2 (2)		3.53 4 (4)	
Ala							11.00 11 (11)	1.02 1 (1)	1.72 2 (2)	9.57 10 (10)	1.90 2 (2)
Pro	1.16 1 (1)						- (1)			0.57 1 (1)	
Tyr							5.65 6 (6)			3.89 4 (4)	1.54 2 (2)
Val	1.61 2 (2)						0.55 1 (1)	0.3 0 (1)	0.56 1 (1)	1.69 2 (2)	
Met							3.85 4 (3)				
Ile	1.55 2 (2)	1.19 1 (1)	1.18 1 (1)	1.06 1 (1)	0.82 1 (1)		0.70 1 (1)			9.88 10 (10)	0.75 1 (1)
Leu	3.30 3 (3)						3.75 4 (4)			2.24 2 (2)	
Phe							1.22 1 (1)	3.40 3 (3)	0.87 1 (1)	1.03 1 (1)	0.96 1 (1)
Lys		1.00 1 (1)	2.00 2 (2)	1.78 2 (2)	0.96 1 (1)	1.28 1 (1)	0.80 1 (1)	1.10 1 (1)	0.89 1 (1)	- (1)	
Tip											
N-Terminal Sequence	Glu-Leu-Gln	Ile-Asn-Lys	Ile-Asn-Lys	Lys-Ile-Glu	Ile-Glu-Lys	Phe-Gln-Ser	Ile-His-Pro	Glu-Ala-Met	Glu-Met-Pro	Tyr-Pro-Val	Val-Leu-Pro
Sequence	Glu2-Arg25	Ile26-Lys28	Ile26-Lys29	Lys29-Lys32	Ile30-Lys32	Phe33-Lys48	Ile49-Lys97	Glu100-Lys105	Glu108-Lys113	Tyr114-Lys169	Val170-Lys176

-fig. 19a-

22 / 22

Peptides	K	L	N	II	III	IV-VI	V	VII	VIII	IX	X
Amino acid	Molar Nearest ratio integer	Molar Nearest ratio integer	Molar Nearest ratio integer	Molar Nearest ratio integer	Molar Nearest ratio integer	Molar Nearest ratio integer	Molar Nearest ratio integer	Molar Nearest ratio integer	Molar Nearest ratio integer	Molar Nearest ratio integer	Molar Nearest ratio integer
Asx		0.68 1(1)				0.89 1				0.94 1	1.87 2
Glx	1.04 1(1)	2.84 3(3)		1.80 2	2.54 3	2.63 3	2.45 2	1.54 2	2.35 2	1.37 1	6.42 6
Ser					1.53 2			0.53 1	1.14 1		2.10 2
Gly		0.70 1(1)	0.69 1(1)	0.60 1			0.71 1		0.58 1		2.19 2
His											1.14 1
Arg	0.68 1(1)	0.80 1(1)		0.74 1			0.89 1				
Thr					0.46 1			0.40 1	0.84 1		2.17 3
Ala	0.78 1(1)					1.11 1				0.86 1	0.54 1
Pro	1.96 2(2)	2.80 3(3)	2.00 2(2)	1.60 2	1.83 2	1.92 2	2.12 2	1.83 2	3.58 4	1.06 1	9.10 10
Tyr	0.40 0(1)	0.75 1(1)			0.35 1	0.12 1	0.27 1	0.18 1			0.48 1
Val	0.92 1(1)	1.95 2(2)	0.95 1(1)	1.60 2	1.10 1	0.80 1	1.71 2	0.77 1	3.28 5		5.45 6
Met	0.36 0(1)	0.16 0(1)				0.89 1			0.60 1	0.72 1	0.92 1
Ile		0.60 1(1)	1.14 1(2)			1.25 1				0.86 1	2.30 2
Leu		3.07 3(3)	0.48 0(0)	0.91 1		1.61 2	2.64 3		1.40 1		4.24 4
Phe		(1)	0.91 1(1)		0.98 1	1.31 1		0.96 1	0.90 1	1.05 1	2.30 2
Lys									0.67 1		1.00 1
Trp											
N Terminal Sequence	Ala-Val-Pro	Asp-Met-Pro	Gly-Pro-Phe	Gln-Glu-Pro	Tyr-Pro-Val	Asp-Met-Pro	Leu-Leu-Tyr	Tyr-Pro-Val	Thr-Pro-Val	Asp-Met-Pro	Ala-Gln-Thr
Sequence	Ala177-Arg183	Asp184-Arg202	Gly203-Val209	Gln194-Arg202	Tyr114-Ser124	Asp184-Val197	Leu191-Arg202	Tyr114-Ser122	Thr80-Lys97	Asp184-Phe190	Ala53-Lys97

-fig. 19b-

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12P21/06 C07K1/00 C07K2/00 //C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12P C07K A23J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,93 18180 (ULICE) 16 September 1993 cited in the application see the whole document ---	1-5,8,9
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 19, 11 May 1992, Columbus, Ohio, US; abstract no. 192692k, 'Esterification of food proteins : characterization of the derivatives by a colorimetric method and by electrophoresis' page 582 ; see abstract & SCI. ALIMENTS, vol.11, no.4, 1991 pages 641 - 652 BERTRAND-HARB, C. ET AL. ---	1-4,7-9

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 March 1995

Date of mailing of the international search report

27.03.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Gac, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 94/01500

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP,A,0 047 879 (TERUMO CORPORATION) 24 March 1982 see page 5 - page 10 ---	1-4,7-9
Y	WO,A,92 15279 (L'OREAL) 17 September 1992 see page 1 - page 4 * exemple 1 pages 6, 7 * ---	1-5,7-9
A	EP,A,0 088 398 (TERUMO KABUSHIKI KAISHA (TERUMO CORPORATION)) 14 September 1983 -----	1-4,6,8, 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/01500

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9318180	16-09-93	FR-A- 2688229	10-09-93
		EP-A- 0630411	28-12-94
		FI-A- 944138	08-09-94
		NO-A- 943212	07-10-94

EP-A-0047879	24-03-82	JP-C- 1441867	30-05-88
		JP-B- 57050480	27-10-82
		JP-A- 57050900	25-03-82
		BE-A- 890307	04-01-82
		CA-A- 1181282	22-01-85
		GB-A, B 2083828	31-03-82

WO-A-9215279	17-09-92	FR-A- 2673374	04-09-92
		EP-A- 0573554	15-12-93

EP-A-0088398	14-09-83	JP-C- 1410105	24-11-87
		JP-A- 58152498	10-09-83
		JP-B- 62017520	17-04-87
		US-A- 4940662	10-07-90

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der c Internationale No
PCT/FR 94/01500

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12P21/06 C07K1/00 C07K2/00 //C07K14/47		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12P C07K A23J		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO,A,93 18180 (ULICE) 16 Septembre 1993 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-5,8,9
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 19, 11 Mai 1992, Columbus, Ohio, US; abstract no. 192692k, 'Esterification of food proteins : characterization of the derivatives by a colorimetric method and by electrophoresis' page 582 ; voir abrégé & SCI. ALIMENTS, vol.11, no.4, 1991 pages 641 - 652 BERTRAND-HARB, C. ET AL. --- -/--	1-4,7-9
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "I" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 20 Mars 1995		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 27 -03- 1995
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Gac, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No

PCT/FR 94/01500

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP,A,0 047 879 (TERUMO CORPORATION) 24 Mars 1982 voir page 5 - page 10 ---	1-4,7-9
Y	WO,A,92 15279 (L'OREAL) 17 Septembre 1992 voir page 1 - page 4 * exemple 1 pages 6, 7 * ---	1-5,7-9
A	EP,A,0 088 398 (TERUMO KABUSHIKI KAISHA (TERUMO CORPORATION)) 14 Septembre 1983 -----	1-4,6,8, 9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux nombres de familles de brevets

Der le Internationale No

PCT/FR 94/01500

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9318180	16-09-93	FR-A- 2688229	10-09-93
		EP-A- 0630411	28-12-94
		FI-A- 944138	08-09-94
		NO-A- 943212	07-10-94

EP-A-0047879	24-03-82	JP-C- 1441867	30-05-88
		JP-B- 57050480	27-10-82
		JP-A- 57050900	25-03-82
		BE-A- 890307	04-01-82
		CA-A- 1181282	22-01-85
		GB-A, B 2083828	31-03-82

WO-A-9215279	17-09-92	FR-A- 2673374	04-09-92
		EP-A- 0573554	15-12-93

EP-A-0088398	14-09-83	JP-C- 1410105	24-11-87
		JP-A- 58152498	10-09-83
		JP-B- 62017520	17-04-87
		US-A- 4940662	10-07-90
